

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

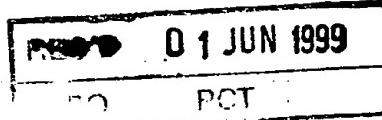
Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (uspto)



FR99/1165

09/720687

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

26 AVR. 1999

Fait à Paris, le

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Martine PLANCHE'.

Martine PLANCHE

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

30045109

THIS PAGE BLANK (USPTO)



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

cerfa
N° 55 -1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réserve à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

22 MAI 1998

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 06456

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

K

DATE DE DÉPÔT

22 MAI 1998

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

brevet d'invention

demande divisionnaire

certificat d'utilité

transformation d'une demande de brevet européen



demande initiale

brevet d'invention

diffère

immédiat

Établissement du rapport de recherche

diffère

immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET ORES
6 avenue de Messine
75008 PARIS
FRANCE

n°du pouvoir permanent références du correspondant téléphone
MJPsd191/143 01.45.52.75.00

certificat d'utilité n°

date

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

SOUCHES MUTANTES DE LACTOBACILLUS BULGARICUS DEPOURVUES D'ACTIVITE
β-GALACTOSIDASE.

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

COMPAGNIE GERVAIS DANONE

Forme juridique

Société Anonyme

Nationalité (s) FRANCAISE

Adresse (s) complète (s)

126, rue Jules Guesde
92302 LEVALLOIS-PERRET

Pays

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

oui

non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

requise pour la 1ère fois

requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

Marie-José VIALLE-PRESLES
(N° 93-2009), Mandataire

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

MJPsd191/143

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

Le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur

PROPRIÉTAIRE DE LA DEMANDE

98 06 456

TITRE DE L'INVENTION : SOUCHE MUTANTE DE LACTOBACILLUS BULGARICUS
DEPOURVUE D'ACTIVITE β -GALACTOSIDASE.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

CABINET ORES
6 avenue de Messine
75008 PARIS
FRANCE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- BENBADIS Laurent
7 avenue de Provence
92160 ANTONY
FRANCE
- BRIGNON Pierre
7 rue des Brasseurs
67200 STRASBOURG
FRANCE
- GENDRE François
49 rue du Maréchal Foch
67200 STRASBOURG
FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) ~~du demandeur~~ du mandataire

Paris, le 22 MAI 1998

Marie-José VIALLE-PRESLES (N° 93 2009)

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découlle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

SOUCHES MUTANTES DE *LACTOBACILLUS BULGARICUS* DEPOURVUES
D'ACTIVITE β -GALACTOSIDASE.

Ces souches et ferment peuvent être utilisés pour l'obtention de produits laitiers fermentés à partir 5 de lait additionné de glucose.

La présente Invention est relative à de nouveaux variants de *bulgaricus* et à leur utilisation pour la préparation de produits laitiers fermentés.

Les yoghourts sont traditionnellement obtenus 10 par fermentation du lait avec une association de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Au cours de la fermentation qui est effectuée à une température d'environ 40 à 45°C, ces bactéries utilisent principalement le lactose comme substrat énergétique, et 15 produisent de l'acide lactique qui entraîne la coagulation du lait ; lorsque le pH atteint une valeur d'environ 4,8 à 4,5, on met fin à cette étape de fermentation (également dénommée « acidification ») en refroidissant le produit. Celui-ci est ensuite maintenu 20 au froid pendant la suite du processus de fabrication et de conditionnement, et jusqu'à sa consommation.

Cependant, le refroidissement ne stoppe pas complètement la fermentation lactique ; même lorsque le produit est maintenu à 4°C, on observe une augmentation 25 progressive de son acidité au cours du temps.

Ce phénomène, connu sous le nom de post-acidification, est responsable d'une dégradation des qualités organoleptiques du produit pendant sa conservation.

30 La post-acidification résulte essentiellement de l'utilisation par les bactéries, et principalement par *L. bulgaricus*, du lactose restant dans le produit à l'issue de l'étape d'acidification contrôlée. Pour l'éviter, il a été proposé d'utiliser des souches de 35 *L. bulgaricus* ne fermentant pas, ou très peu, le lactose.

Une des enzymes essentielles pour la fermentation du lactose est la β -galactosidase, qui hydrolyse le lactose en glucose et galactose. Il a donc été proposé, pour obtenir des souches non-postacidifiantes de *L. bulgaricus*, de produire des mutants artificiels, ou de sélectionner des mutants naturels, chez lesquels l'activité de cette enzyme était affectée.

Par exemple, le Brevet EP 402 450 au nom de GENENCOR décrit l'obtention, par mutagénèse localisée du gène de la β -galactosidase, de mutants conditionnels de *L. bulgaricus*, chez lesquels la β -galactosidase qui est active lors de la fermentation à 40°C, perd son activité à la température ou au pH correspondant aux conditions de conservation des produits laitiers fermentés.

La Demande JP 90053437 décrit l'obtention d'un mutant artificiel de *L. bulgaricus* ayant complètement perdu la capacité de fermenter le lactose, et la sélection d'un mutant naturel, à capacité réduite de fermentation du lactose ; ces mutants sont néanmoins capables, l'un comme l'autre, de se développer et d'acidifier normalement en présence de *S. thermophilus*, à condition que le milieu soit supplémenté en glucose. Les sous-cultures de ces mutants conservent leurs caractéristiques d'acidification, dans du lait dépourvu de glucose, après 10 repiquages.

Le Brevet EP 0518 096, au nom de la SOCIETE DES PRODUITS NESTLE, propose d'utiliser pour la fabrication de yoghourt, des mutants faiblement postacidifiants de *Lactobacillus bulgaricus* préalablement sélectionnés sur le critère de la délétion d'un fragment du gène de la β -galactosidase. Le criblage et la caractérisation de ces mutants sont facilités, du fait que la présence de cette délétion peut être facilement vérifiés sur des profils de restriction. En outre, les délétions sont connues pour être des mutations

irréversibles, ce qui permet d'obtenir facilement des souches mutantes stables à partir de la souche mère. Le Brevet EP 0518 096 décrit 2 types de mutants faiblement postacidifiants sélectionnés de la sorte. Les premiers 5 ont une délétion touchant uniquement le gène de la β -galactosidase ; lorsqu'ils sont associés à *S. thermophilus* et cultivés sur du lait, ils présentent, même en l'absence d'ajout de glucose, des propriétés de croissance et d'acidification comparables à celles de la 10 souche sauvage dont ils sont issus. Les seconds présentent une délétion plus importante, s'étendant sur au moins 1kb en aval du gène de la β -galactosidase ; lorsqu'ils sont associés à *S. thermophilus* ils croissent plus lentement et acidifient beaucoup moins que la souche 15 sauvage dont ils sont issus ; l'ajout de glucose au milieu de culture n'a que peu d'influence sur leurs propriétés d'acidification et de post-acidification.

Les mutants naturels chez lesquels la β -galactosidase est inactive sont beaucoup plus difficiles 20 à sélectionner et à maintenir en cultures pures dans le cas de mutations ponctuelles que dans le cas de mutants de délétion ; ceci s'explique par la probabilité plus faible qu'une mutation ponctuelle produise une protéine 25 inactive, par la plus grande difficulté pour localiser et caractériser les mutations ponctuelles par des profils de restriction, et par le taux de réversion très important.

La Demanderesse a maintenant trouvé d'autres mutants naturels de *L. bulgaricus*, ne portant pas de délétion dans le gène codant pour la β -galactosidase, et 30 présentant des caractéristiques technologiques avantageuses. Dans le cadre de la présente invention, un mutant non-sens, incapable d'assimiler le lactose, a été isolé à partir d'une culture d'un *L. bulgaricus* sauvage. Associé à *S. thermophilus*, en culture sur du lait, il 35 croît et acidifie beaucoup plus lentement que la souche sauvage dont il est issu. En revanche, sa croissance et

son acidification sont quasi-normales lorsque le lait est supplémenté en glucose.

La présente Invention a pour objet une souche mutante de *L. bulgaricus* dépourvue d'activité 5 β -galactosidase, caractérisée en ce qu'elle porte une mutation introduisant un codon non-sens dans l'une des séquences codantes de l'opéron lactose et en particulier celle codant pour la β -galactosidase.

Une souche de *L. bulgaricus* conforme à 10 l'invention a été déposée selon le Traité de Budapest le 14 janvier 1998, auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) tenue par l'Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, à Paris, sous le numéro I-1968.

15 Cette souche présente les caractéristiques morphologiques et biochimiques suivantes :

- Morphologie : Microorganisme Gram-positif, bacilles fins, pléomorphes, asporogènes, isolés ou en courtes chaînes, immobiles.
- 20 - Métabolisme : homofermentaire, catalase (-).
- Fermentation des sucres : D-glucose (+), D-fructose (+), D-mannose (+), esculine (+).

Les Inventeurs ont séquencé l'opéron lactose chez le mutant I-1968. La séquence correspondante est 25 représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1. Les séquences des produits de traduction (perméase et β -galactosidase) sont respectivement représentées sous les numéros SEQ ID NO:2 et SEQ ID NO:3

30 L'analyse de cette séquence fait apparaître deux mutations ponctuelles : l'une, au niveau du gène de la perméase (position 122 de la séquence SEQ ID NO:1), induit un changement d'acide aminé (Lys \rightarrow Asn) ; l'autre, au niveau du gène de la β -galactosidase (position 4519 de 35 la séquence SEQ ID NO:1), introduit un codon de terminaison. Bien que conservant ses sites actifs

(positions 464 et 531), la β -galactosidase produite par ce mutant est inactive. Les Inventeurs ont en outre constaté que cette mutation restait stable après plusieurs séries de repiquages sur un milieu de culture 5 contenant du glucose. En revanche, sur un milieu de culture en absence de glucose, cette mutation non-sens réverte très rapidement à un taux d'environ 10^{-6} .

La présente invention englobe également des souches mutantes incapables d'assimiler le lactose, 10 dérivées de la souche I-1968. De telles souches peuvent par exemple être obtenues en induisant par mutagénèse dirigée; d'autres mutations dans l'opéron lactose de la souche I-1968.

La présente Invention a également pour objet 15 un ferment lactique, en particulier un ferment du yoghourt, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une souche de *L. bulgaricus* conforme à l'Invention telle que définie ci-dessus, de préférence associée à au moins une souche de *S. thermophilus*.

Pour l'obtention d'un ferment conforme à 20 l'invention, on peut utiliser n'importe quelle souche de *S. thermophilus* convenant pour la fabrication de yoghourt ; le choix d'une ou plusieurs souches de *S. thermophilus* peut être effectué en fonction des 25 caractéristiques additionnelles que l'on souhaite éventuellement conférer au produit fini.

A titre d'exemple de souches de *S. thermophilus* pouvant être utilisées en association avec une souche de *L. bulgaricus* conforme à l'invention, 30 on peut citer les souches suivantes, déposées auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) tenue par l'Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, à Paris :

- la souche déposée le 25 août 1994, sous le 35 numéro I-1470, et la souche déposée le 23 août 1995, sous

le numéro I-1620 ; ces 2 souches sont décrites dans la Demande Européenne publiée sous le numéro 96/06924 ;

- les souches déposées le 30 décembre 1994, sous les numéros I-1520 et I-1521 ; ces 2 souches sont 5 décrites dans la Demande Internationale PCT WO 96/20607 :

- la souche déposée le 24 octobre 1995 sous le numéro I-1630 ; les caractéristiques de cette souche sont décrites dans la Demande Internationale PCT WO 96/01701.

Ces souches peuvent être associées entre 10 elles, ou avec une ou plusieurs autres souches industrielles de *S. thermophilus*.

La ou les souche(s) de *S. thermophilus* sont associées avec la ou les souche(s) de *L. bulgaricus* conformes à l'invention de la même manière et dans les 15 mêmes proportions que dans les fermentations traditionnelles ; la population de bactéries *L. bulgaricus* conformes à l'invention peut par exemple représenter entre 10 et 90%, de préférence entre 20 et 50%, de la population bactérienne totale.

20 La présente Invention a également pour objet un procédé de préparation d'un produit laitier fermenté caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle on fermente du lait à l'aide d'un ferment comprenant au moins une souche de *L. bulgaricus* conforme 25 à l'Invention, en présence d'au moins un sucre assimilable par ladite souche ; il peut s'agir notamment du fructose, du mannose, et de préférence, du glucose. Avantageusement ledit produit laitier fermenté est un yoghourt.

30 Le procédé conforme à l'Invention est similaire aux procédés traditionnels de préparation du yoghourt en ce qui concerne les principales modalités de mise en œuvre de l'étape d'acidification contrôlée ; en particulier cette acidification est effectuée à une 35 température comprise entre 20 et 45°C, et de préférence entre 30 et 45°C, et en « batch », c'est à dire en une

seule étape et en utilisant une seule cuve de fermentation.

La durée de cette étape d'acidification contrôlée est généralement de l'ordre de 6 à 24 heures, 5 et de préférence de l'ordre de 6 à 16 heures ; elle est donc plus longue que dans le cas des procédés classiques de préparation de yogourt (où elle est de 3 à 5 heures à 44°C). En effet, les souches de *L. bulgaricus* conformes à l'invention, même associées à *S. thermophilus*, croissent 10 et acidifient beaucoup plus lentement que les souches sauvages.

En outre, la vitesse de croissance et d'acidification des souches de *L. bulgaricus* conformes à l'invention varie très significativement en fonction de 15 la quantité de glucose ajoutée au lait. Cette propriété permet de contrôler leur croissance et leur acidification, par simple addition de la quantité souhaitée de glucose en début de fermentation.

Les Inventeurs ont en outre observé que, lors 20 de la mise en oeuvre de souches de *L. bulgaricus* ou de ferments conformes à l'invention, l'acidification ralentit considérablement lorsque le pH atteint la zone de 4,8 à 4,5, (qui correspond à la zone de pH où l'on arrête l'acidification dans le cas d'un procédé 25 traditionnel), et se stabilise, même si l'on maintient le lait à température de fermentation, à un pH plancher. La valeur de ce pH plancher dépend essentiellement de la quantité de glucose ajoutée.

Cette propriété permet de réduire, voire 30 d'éliminer la phase de refroidissement utilisée dans les procédés traditionnels de fabrication du yogourt pour stopper la fermentation. Elle supprime en outre la nécessité de mesurer le pH pour déterminer le moment optimal d'arrêt de la fermentation ; pour un ferment et 35 une quantité de glucose ajouté déterminés, il est possible, sans risque de sur-acidification, d'arrêter la

fermentation au bout d'une durée donnée, calculée en fonction du temps nécessaire pour atteindre le pH plancher. Ceci permet de mieux contrôler la régularité du pH final et la texture du produit en fin de fermentation.

5 Avantageusement, pour la mise en œuvre du procédé conforme à l'invention, et selon le degré d'acidification auquel on souhaite parvenir, la quantité de glucose ajoutée au lait préalablement à la fermentation est comprise entre 0,5 et 10 g/l, de 10 préférence entre 0,5 et 5 g/l.

Le produit fermenté obtenu de la sorte peut être conservé plusieurs heures à une température proche de la température de fermentation, sans baisse du pH, ce qui permet de supprimer les installations de stockage 15 intermédiaire au froid et d'augmenter la capacité des cuves de fermentation.

La mise en œuvre du procédé conforme à l'invention permet de réduire la postacidification dans les produits fermentés au cours de leur conservation à 20 plus long terme. Le degré de postacidification peut varier selon la composition du ferment et la quantité de glucose utilisée. Cependant la postacidification est toujours nettement inférieure à celle observée dans le cas des yaourts obtenus avec les fermentes et les procédés 25 traditionnels.

Par exemple, des expérimentations effectuées par les inventeurs ont montré que dans les mêmes conditions de conservation (28 jours de conservation à 10°C), le ΔpH (différence entre le pH à J0 et le pH à 30 J28) était compris entre 0,05 et 0,4 dans le cas des produits obtenus à l'aide d'un ferment conforme à l'invention, alors qu'il était toujours supérieur à 0,7 dans le cas de fermentes témoins dans lesquels la souche de *L. bulgaricus* conforme à l'invention était remplacée 35 par une souche sauvage.

Cette faible post-acidification s'accompagne d'une bonne survie des souches du ferment ; la population de *L. bulgaricus* en fin de conservation, dans le produit fermenté obtenu conformément à l'invention n'est que 5 légèrement inférieure à celle du produit témoin.

La présente invention a également pour objet les produits laitiers fermentés susceptibles d'être obtenus en mettant en œuvre un procédé conforme à l'invention.

10 Ces produits peuvent se conserver pendant plus longtemps et à température plus élevées que les produits obtenus par les procédés traditionnels, et possèdent des caractéristiques organoleptiques qui restent stables au cours de la conservation.

15 **EXEMPLE 1 : DOSAGE BIOCHIMIQUE DE L'ACTIVITE BETA-GALACTOSIDASE D'UN MUTANT CONFORME A L'INVENTION.**

L'activité β -galactosidase de la souche I-1968 a été comparée à celle de la souche sauvage de *L. bulgaricus* (dénommée ci-après LbS) dont elle est 20 issue.

On cultive les bactéries pendant une nuit sur milieu MRS agar (MERCK) à 37°C, en jarre d'anaérobiose (MERCK) en présence d'un fixateur d'oxygène (AnaérocultA, MERCK).

25 Une dose de 10 microlitres (NUNC) de bactéries est resuspendue dans 1 millilitre d'eau stérile. Les bactéries sont lysées par 2 cycles d'agitation forte, 20 secondes à 5000 rotations par minute en présence de microbilles de verre (0,5 mm de diamètre, BIOSPEC PRODUCTS), puis rajout de 0,15 ml de chloroforme. On agite l'ensemble pendant 30 minutes à 37°C, puis on complète à 2 ml avec de l'eau stérile à 4°C. L'activité bêta-galactosidase est alors mesurée : à partir de 0,2 ml 30 de la suspension cellulaire on rajoute 1,2 ml de tampon NaH₂PO₄ 0,067M ; pH6,8 ; 0,05 ml de L-cystéine (SIGMA) à 35 t0 0,05 ml de O-nitrophényl- β -D-galactopyranoside

(SIGMA). La réaction enzymatique est arrêtée après 0, 2, 5 ou 10 min. par 1 ml de tampon Na_2CO_3 10%, et on effectue une mesure de la DO à 400 nanomètres sur le surnageant, après centrifugation du milieu réactionnel.

5 Les activités galactosidase de la souche-mère LbS et du mutant I-1968 conforme à l'Invention mesurées en fonction du temps sont représentées sur la Figure 1.

10 Ces résultats montrent que la β -galactosidase est totalement inactive chez le mutant conforme à l'Invention.

EXEMPLE 2 : STABILITE DU MUTANT I-1968 DE *L. BULGARICUS*

La stabilité du mutant I-1968 a été testée dans des milieux contenant comme sources de carbone soit un mélange de glucose et de lactose, soit du lactose 15 seulement.

Une culture de I-1968 obtenue sur milieu MRS contenant du glucose est mise en sous-culture sur du lait stérilisé additionné d'autolysat de levure (2g/l), et supplémenté ou non avec du glucose (20g/l). Lorsqu'un pH de 5,2 20 (coagulation du lait) est atteint, on prélève des échantillons de chaque sous-culture, sur lesquels on analyse la capacité des bactéries à fermenter les sucres, ainsi que la présence d'activité β -galactosidase (test sur plaque X-gal : colonies blanches = β -galactosidase moins ; colonies bleues = β -galactosidase plus).

25 Les résultats sont illustrés par le Tableau I ci-dessous.

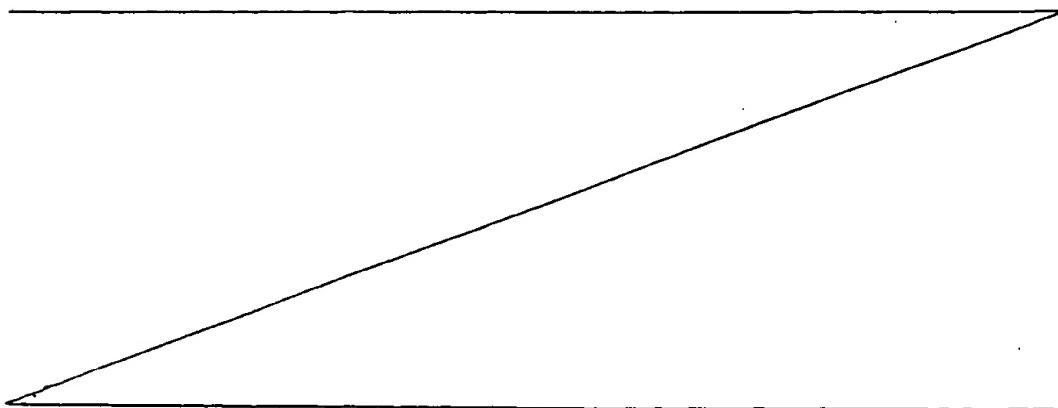


TABLEAU I

Milieu	Lait + glucose (20g/l)	Lait
Temps pour atteindre pH 5.2	6h00	20h00
Fermentation des sucres	glucose, fructose, mannose	lactose, glucose, fructose, mannose
Test sur plaque X-gal	100% Colonies blanches	20% colonies blanches 80% colonies bleues

Ces résultats montrent qu'en présence de glucose, la souche I-1968 ne réverte pas vers une souche capable d'utiliser le lactose. En revanche dans un milieu contenant du lactose comme seule source de carbone, on observe une réversion rapide de la souche I-1968 vers l'état original.

EXEMPLE 3 : PROPRIETES D'ACIDIFICATION, DE POSTACIDIFICATION ET DE SURVIE DU VARIANT I-1968 DE L. *BULGARICUS* EN SYMBIOSE AVEC *S. THERMOPHILUS* : CAS D'UN PROCEDE DE FABRICATION D'UN YOGHOURT FERME (FERMENTATION EN ETUVE VENTILEE)

On prépare des fermentations de yogourt associant la souche I-1968 conforme à l'invention avec différentes souches industrielles de *S. thermophilus* (les souches de *S. thermophilus* utilisées sont dénommées ci-après ST1, ST2 et ST3).

A titre de comparaison, on prépare des fermentations associant la souche-mère LbS, et les mêmes souches de *S. thermophilus*.

Pour la préparation des fermentations, les souches sont ensemencées séparément à 1% sur la composition suivante :

Composition pour 1 litre :

135 g de poudre de lait écrémé
2 g d'autolysat de levure

920 ml d'eau distillée

20 g de glucose (pour la souche I-1968 uniquement)

Hydratation: 10 min

Pasteurisation: 30 min à 95°C

5 Le lait est ensuite refroidi à 44°C et inoculé, puis incubé à 44°C jusqu'à obtention d'une acidité de 85°D (degrés Dornic) pour les streptocoques et de 80°D pour les lactobacilles.

10 Les cultures sont ensuite réunies pour obtenir un ferment constitué à 80% de *Streptococcus thermophilus* et à 20% de *Lactobacillus bulgaricus*.

Les ferments ainsi obtenus sont utilisés pour inoculer la préparation suivante :

Composition pour 1 litre :

15 99% de lait

0, 1, ou 2 g/l de glucose

Hydratation: 10 min

Pasteurisation: 10 min à 95°C

Le lait est ensuite refroidi à 44°C et inoculé
20 à 1%.

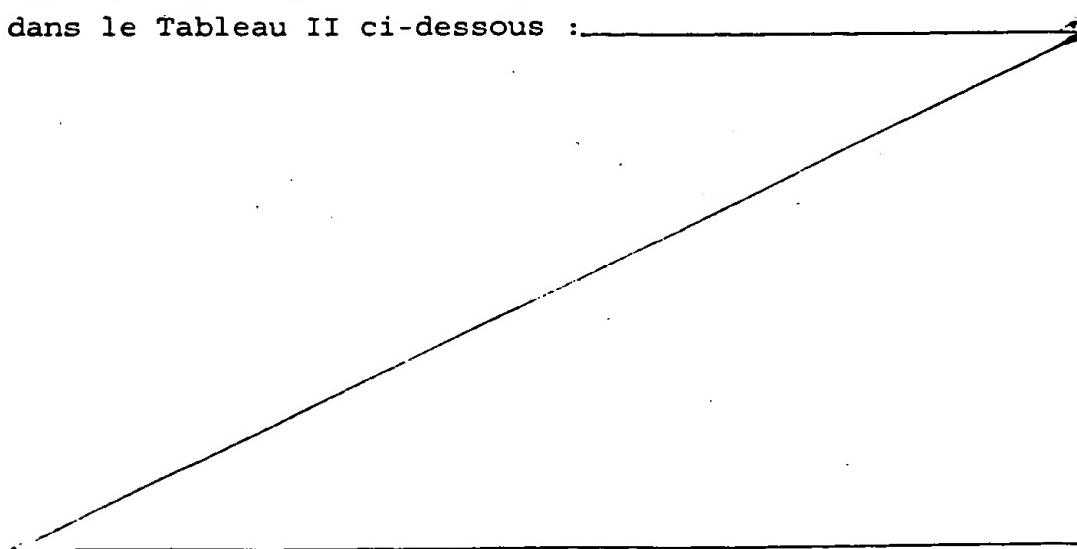
Pour chaque expérimentation, la composition du ferment et la quantité de glucose ajoutée sont indiquées dans le Tableau II ci-dessous : 

TABLEAU II

Expérience	Glucos g/l	Souchs	Pourcentage
1	0	ST 3 ST 2 LbS	64 % 16 % 20 %
2	0	ST 3 ST 2 I-1968	64 % 16 % 20 %
3	1	ST 3 ST 2 I-1968	64 % 16 % 20 %
4	0	ST 1 LbS	80 % 20 %
5	0	ST 1 I-1968	80 % 20 %
6	2	ST 1 I-1968	80 % 20 %

Après inoculation, le lait est réparti en ballons et incubé à une température de 44°C. Le profil d'acidification est suivi pendant l'incubation. Les 5 produits sont décaillés à pH 4,6 par refroidissement en cellule froide (16 heures à 4°C).

Les produits sont ensuite soumis à un test de conservation à 10°C. Dans ce test, on mesure le pH et l'acidité Dornic après 1, 14, 21 et 28 jours de 10 conservation.

Les résultats d'acidification (temps pour atteindre un pH de 4,6 et valeur du pH à 24h) sont présentés dans le tableau III ci-dessous :

TABLEAU III

Expérience	Temps pour atteindre pH 4,6 (min)	Temps pour atteindre pH 4,5 (min)	pH à 24h
1	215	236	3,67
2	550	778	4,33
3	416	507	4,26
4	225	241	3,67
5	660	>1500	4,54
6	390	465	4,35

15 Les résultats du test de conservation à 10°C (suivi du pH et de l'acidité Dornic), et de la survie

(populations de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*) à 28 jours sont présentés dans le tableau IV ci-dessous :

TABLEAU IV

Expérience	Temps de stockage (jours)	pH	Acidité Dornic	<i>Streptococcus thermophilus</i> cellules/ml	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> cellules/ml
1	1	4,41	101	7,25E+08	3,35E+08
1	14	3,98	140	ND	ND
1	21	3,95	145	ND	ND
1	28	3,9	148	7,35E+08	3,30E+08
2	1	4,5	93	5,60E+08	2,90E+07
2	14	4,23	110	ND	ND
2	21	4,18	112	ND	ND
2	28	4,19	114	5,65E+08	1,87E+07
3	1	4,49	96	6,90E+08	7,45E+07
3	14	4,14	115	ND	ND
3	21	4,15	117	ND	ND
3	28	4,15	120	8,65E+08	6,30E+07
4	1	4,39	105	6,30E+07	4,40E+08
4	14	3,91	145	ND	ND
4	21	3,9	151	ND	ND
4	28	3,85	157	4,70E+08	6,40E+08
5	1	4,6	85	9,05E+08	6,70E+07
5	14	4,58	80	ND	ND
5	21	4,53	80	ND	ND
5	28	4,61	79	9,40E+08	7,00E+07
6	1	4,51	89	1,05E+09	1,96E+08
6	14	4,38	90	ND	ND
6	21	4,39	96	ND	ND
6	28	4,42	90	1,62E+09	1,91E+08

ND : Non Déterminé

5 Ces résultats montrent que les yoghourts réalisés avec les symbioses associant la souche I-1968 à une ou deux souches de *S. thermophilus* présentent une postacidification extrêmement réduite par rapport aux mêmes symbioses avec la souche-mère LbS, tout en conservant une population abondante en 10 fin de fermentation et une bonne survie pendant 28 jours à 10°C.

15 L'arrêt de l'acidification et le maintien du pH aux alentours de 4,6 à 4,5 pendant au moins 24 heures à 44°C permet dans le cadre de la fabrication de yogourt brassé, de réduire, voire d'éliminer la phase de refroidissement en cuve qui est habituellement mise en œuvre.

LISTE DE SEQUENCES

NOMBRE DE SEQUENCES: 3

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 5059 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 122..1873

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 1877..4519

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GCTTGTCTCA CGCTTGTCGT ACGCGGCCGG TGCCTTGGC AACGACGTCT TCTACGCGAC	60
TCTGTCAACC TACTTTATCG TCTTCGTCAC CACCCACCTC TTTAATGCCG GTGACCACAA	120
G ATG ATC TTT ATC ATC ACC AAC TTG ATC ACC GCC ATC CGG ATC GGG Met Ile Phe Ile Ile Thr Asn Leu Ile Thr Ala Ile Arg Ile Gly	166
1 5 10 15	
GAA GTC CTG CTC GAC CCC TTG ATC GGT AAC GCC ATC GAC CGG ACC GAA Glu Val Leu Leu Asp Pro Leu Ile Gly Asn Ala Ile Asp Arg Thr Glu	214
20 25 30	
AGC CGG TGG GGG AAG TTC AAG CCC TGG GTT GTG GGC GGG GGG ATC ATC Ser Arg Trp Gly Lys Phe Lys Pro Trp Val Val Gly Gly Ile Ile	262
35 40 45	
AGC TCA TTA GCC CTC TTA GCC CTC TTT ACC GAC TTT GGC GGC ATT AAC Ser Ser Leu Ala Leu Ala Leu Phe Thr Asp Phe Gly Gly Ile Asn	310
50 55 60	
CAA AGC AAC CCC GTT GTT TAC TTA GTA ATC TTC GGT ATT GTT TAC TTG Gln Ser Asn Pro Val Val Tyr Leu Val Ile Phe Gly Ile Val Tyr Leu	358
65 70 75	
ATT ATG GAT ATC TTC TAC TCA TTT AAA GAC ACT GGC TTC TGG GCC ATG Ile Met Asp Ile Phe Tyr Ser Phe Lys Asp Thr Gly Phe Trp Ala Met	406
80 85 90 95	
ATC CCG GCC TTG TCC CTG GAT TCC CGG GAA AGA GAG AAG ACC TCC ACC Ile Pro Ala Leu Ser Leu Asp Ser Arg Glu Arg Glu Lys Thr Ser Thr	454
100 105 110	

TTC GCC AGA GTC GGC TCC ACC ATC GGG GCC AAC CTG GTC GGG GTA GTC Phe Ala Arg Val Gly Ser Thr Ile Gly Ala Asn Leu Val Gly Val Val 115 120 125	502
ATC ACC CCA ATC ATC CTC TTC TTC TCG GCC AGC AAG GCC AAC CCC AAC Ile Thr Pro Ile Ile Leu Phe Phe Ser Ala Ser Lys Ala Asn Pro Asn 130 135 140	550
GGG GAT AAG CAG GGC TGG TTC TTT GCC TTG ATC GTG GCC ATT GTC Gly Asp Lys Gln Gly Trp Phe Phe Ala Leu Ile Val Ala Ile Val 145 150 155	598
GGC ATC TTG ACC TCA ATT ACC GTT GGT CTT GGT ACT CAC GAA GTA AAA Gly Ile Leu Thr Ser Ile Thr Val Gly Leu Gly Thr His Glu Val Lys 160 165 170 175	646
TCC GCC CTG CGG GAA AGC AAT GAA AAG ACC ACT TTG AAG CAG GTC TTT Ser Ala Leu Arg Glu Ser Asn Glu Lys Thr Thr Leu Lys Gln Val Phe 180 185 190	694
AAG GTC CTG GGG CAA AAC GAC CAG CTC CTC TGG CTG GCC TTT GCC TAC Lys Val Leu Gly Gln Asn Asp Gln Leu Leu Trp Leu Ala Phe Ala Tyr 195 200 205	742
TGG TTT TAC GGC CTG GGT ATC AAC ACC CTG AAC GCT CTG CAA CTT TAC Trp Phe Tyr Gly Leu Gly Ile Asn Thr Leu Asn Ala Leu Gln Leu Tyr 210 215 220	790
TAC TTC TCA TAC ATC TTA GGC GAT GCC CGC GGC TAC AGC CTG CTT TAC Tyr Phe Ser Tyr Ile Leu Gly Asp Ala Arg Gly Tyr Ser Leu Leu Tyr 225 230 235	838
ACC ATC AAC ACC TTT GTC GGT TTA ATC TCT GCA TCC TTC TTC CCA TCA Thr Ile Asn Thr Phe Val Gly Leu Ile Ser Ala Ser Phe Phe Pro Ser 240 245 250 255	886
CTG GCC AAG AAG TTC AAC AGA AAT CGC CTC TTC TAC GCC TGC ATC GCG Leu Ala Lys Phe Asn Arg Asn Arg Leu Phe Tyr Ala Cys Ile Ala 260 265 270	934
G TG ATG CTG TTA GGG ATC GGG GTC TTC TCC GTG GCC AGC GGT TCT CTG Val Met Leu Leu Gly Ile Gly Val Phe Ser Val Ala Ser Gly Ser Leu 275 280 285	982
GCC CTG TCC CTT GTT GGG GCA GAA TTC TTC TTT ATT CCG CAG CCT CTG Ala Leu Ser Leu Val Gly Ala Glu Phe Phe Ile Pro Gln Pro Leu 290 295 300	1030
GCC TTC CTG GTC GTT TTG ATG ATC ATC TCT GAC GCT GTT GAA TAC GGC Ala Phe Leu Val Val Leu Met Ile Ile Ser Asp Ala Val Glu Tyr Gly 305 310 315	1078
CAG CTG AAA ACT GGC CAC AGA GAC GAA GCT TTG ACC CTG TCT GTC CGG Gln Leu Lys Thr Gly His Arg Asp Glu Ala Leu Thr Leu Ser Val Arg 320 325 330 335	1126

CCA TTG GTC GAT AAG CTG GGC GGG GCC TTG TCC AAC TGG TTT GTT TCC Pro Leu Val Asp Lys Leu Gly Gly Ala Leu Ser Asn Trp Phe Val Ser 340 345 350	1174
TTG ATT GCC TTA ACT GCC GGC ATG ACC ACT GGG GCG ACT GCC TCA ACA Leu Ile Ala Leu Thr Ala Gly Met Thr Thr Gly Ala Thr Ala Ser Thr 355 360 365	1222
ATT ACA GCT CAT GGC CAG ATG GTC TTC AAG TTA GCT ATG TTT GCC TTA Ile Thr Ala His Gly Gln Met Val Phe Lys Leu Ala Met Phe Ala Leu 370 375 380	1270
CCG GCA GTC ATG CTC TTG ATC GCT GTT TCT ATT TTC GCC AAA AAG GTC Pro Ala Val Met Leu Leu Ile Ala Val Ser Ile Phe Ala Lys Lys Val 385 390 395	1318
TTC TTG ACT GAA GAA AAG CAC GCG GAA ATC GTC GAC CAG CTG GAA ACT Phe Leu Thr Glu Glu Lys His Ala Glu Ile Val Asp Gln Leu Glu Thr 400 405 410 415	1366
CAA TTC AGC CAA AGC CAT GCC CAA AAG CCG GCG CAA GCT GAA AGC TTC Gln Phe Ser Gln Ser His Ala Gln Lys Pro Ala Gln Ala Glu Ser Phe 420 425 430	1414
ACT TTG GCC AGC CCA GTC TCC GGA CAA TTA ATG AAC CTG GAC ATG GTT Thr Leu Ala Ser Pro Val Ser Gly Gln Leu Met Asn Leu Asp Met Val 435 440 445	1462
GAC GAC CCG GTC TTT GCC GAC AAA AAG TTA GGC GAC GGC TTT GCC CTG Asp Asp Pro Val Phe Ala Asp Lys Lys Leu Gly Asp Gly Phe Ala Leu 450 455 460	1510
GTG CCA GCA GAC GGT AAG GTC TAC GCG CCA TTT GCC GGT ACT GTC CGC Val Pro Ala Asp Gly Lys Val Tyr Ala Pro Phe Ala Gly Thr Val Arg 465 470 475	1558
CAG CTG GCC AAG ACC CGG CAC TCG ATC GTC CTG GAA AAT GAA CAT GGG Gln Leu Ala Lys Thr Arg His Ser Ile Val Leu Glu Asn Glu His Gly 480 485 490 495	1606
GTC TTG GTC TTG ATT CAC CTT GGC CTG GGC ACG GTC AAA TTA AAC GGG Val Leu Val Leu Ile His Leu Gly Leu Gly Thr Val Lys Leu Asn Gly 500 505 510	1654
ACT GGC TTT GTC AGC TAT GTT GAA GAG GGC AGC CAG GTC GAA GGC Thr Gly Phe Val Ser Tyr Val Glu Glu Gly Ser Gln Val Glu Ala Gly 515 520 525	1702
CAG CAG ATC CTG GAA TTC TGG GAC CCG GCG ATC AAG CAG GCC AAG CTG Gln Gln Ile Leu Glu Phe Trp Asp Pro Ala Ile Lys Gln Ala Lys Leu 530 535 540	1750
GAC GAC ACG GTA ATC GTG ACC GTC ATC AAC AGC GAA ACT TTC GCA AAT Asp Asp Thr Val Ile Val Thr Val Ile Asn Ser Glu Thr Phe Ala Asn	1798

545	550	555	
AGC CAG ATG CTC TTG CCG ATC GGC CAC AGC GTC CAA GCC CTG GAT GAT Ser Gln Met Leu Leu Pro Ile Gly His Ser Val Gln Ala Leu Asp Asp 560 565 570 575			1846
GTA TTC AAG TTA GAA GGG AAG AAT TAG AAA ATG AGC AAT AAG TTA GTA Val Phe Lys Leu Glu Gly Lys Asn * Met Ser Asn Lys Leu Val 580 1 5			1894
AAA GAA AAA AGA GTT GAC CAG GCA GAC TTG GCC TGG CTG ACT GAC CCG Lys Glu Lys Arg Val Asp Gln Ala Asp Leu Ala Trp Leu Thr Asp Pro 10 15 20			1942
GAA GTT TAC GAA GTC AAT ACA ATT CCC CCG CAC TCC GAC CAT GAG TCC Glu Val Tyr Glu Val Asn Thr Ile Pro Pro His Ser Asp His Glu Ser 25 30 35			1990
TTC CAA AGC CAG GAA GAA CTG GAG GAG GGC AAG TCC AGT TTA GTG CAG Phe Gln Ser Gln Glu Leu Glu Gly Lys Ser Ser Leu Val Gln 40 45 50			2038
TCC CTG GAC GGG GAC TGG CTG ATT GAC TAC GCT GAA AAC GGC CAG GGA Ser Leu Asp Gly Asp Trp Leu Ile Asp Tyr Ala Glu Asn Gly Gln Gly 55 60 65 70			2086
CCA GTC AAC TTC TAT GCA GAA GAC TTT GAC GAT AGC AAT TTT AAG TCA Pro Val Asn Phe Tyr Ala Glu Asp Phe Asp Asp Ser Asn Phe Lys Ser 75 80 85			2134
GTC AAA GTA CCC GGC AAC CTG GAA CTG CAA GGC TTT GGC CAG CCC CAG Val Lys Val Pro Gly Asn Leu Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln Pro Gln 90 95 100			2182
TAT GTC AAC GTC CAA TAT CCA TGG GAC GGC AGT GAG GAG ATT TTC CCG Tyr Val Asn Val Gln Tyr Pro Trp Asp Gly Ser Glu Glu Ile Phe Pro 105 110 115			2230
CCC CAA ATT CCA AGC AAA AAT CCG CTC GCT TCT TAT GTC AGA TAC TTT Pro Gln Ile Pro Ser Lys Asn Pro Leu Ala Ser Tyr Val Arg Tyr Phe 120 125 130			2278
GAC CTG GAT GAA GCT TTC TGG GAC AAG GAA GTC AGC TTG AAG TTT GAC Asp Leu Asp Glu Ala Phe Trp Asp Lys Glu Val Ser Leu Lys Phe Asp 135 140 145 150			2326
GGG GCG GCA ACA GCC ATC TAT GTC TGG CTG AAC GGC CAC TTC GTC GGC Gly Ala Ala Thr Ala Ile Tyr Val Trp Leu Asn Gly His Phe Val Gly 155 160 165			2374
TAC GGG GAA GAC TCC TTT ACC CCA AGC GAG TTT ATG GTT ACC AAG TTC Tyr Gly Glu Asp Ser Phe Thr Pro Ser Glu Phe Met Val Thr Lys Phe 170 175 180			2422
CTC AAG AAA GAA AAT AAC CGC CTG GCA GTG GCT CTC TAC AAG TAT TCT			2470

Leu Lys Lys Glu Asn Asn Arg Leu Ala Val Ala Leu Tyr Lys Tyr Ser			
185	190	195	
TCC GCC TCC TGG CTG GAA GAC CAG GAC TTC TGG CGC ATG TCT GGT TTG			2518
Ser Ala Ser Trp Leu Glu Asp Gln Asp Phe Trp Arg Met Ser Gly Leu			
200	205	210	
TTC AGA TCA GTG ACT CTT CAG GCC AAG CCG CGT CTG CAC TTG GAG GAC			2566
Phe Arg Ser Val Thr Leu Gln Ala Lys Pro Arg Leu His Leu Glu Asp			
215	220	225	230
CTT AAG CTT ACG GCC AGC TTG ACC GAT AAC TAC CAA AAA GGA AAG CTG			2614
Leu Lys Leu Thr Ala Ser Leu Thr Asp Asn Tyr Gln Lys Gly Lys Leu			
235	240	245	
GAA GTC GAA GCC AAT ATT GCC TAC CGC TTG CCA AAT GCC AGC TTT AAG			2662
Glu Val Glu Ala Asn Ile Ala Tyr Arg Leu Pro Asn Ala Ser Phe Lys			
250	255	260	
CTG GAA GTG CGG GAT AGT GAA GGT GAC TTG GTT GCT GAA AAG CTG GGC			2710
Leu Glu Val Arg Asp Ser Glu Gly Asp Leu Val Ala Glu Lys Leu Gly			
265	270	275	
CCA ATC AGA AGC GAG CAG CTG GAA TTC ACT CTG GCT GAT TTG CCA GTA			2758
Pro Ile Arg Ser Glu Gln Leu Glu Phe Thr Leu Ala Asp Leu Pro Val			
280	285	290	
GCT GCC TGG AGC GCG GAA AAG CCT AAC CTT TAC CAG GTC CGC CTG TAT			2806
Ala Ala Trp Ser Ala Glu Lys Pro Asn Leu Tyr Gln Val Arg Leu Tyr			
295	300	305	310
TTA TAC CAG GCA GGC AGC CTC TTA GAG GTT AGC CGG CAG GAA GTG GGT			2854
Leu Tyr Gln Ala Gly Ser Leu Leu Glu Val Ser Arg Gln Glu Val Gly			
315	320	325	
TTC CGC AAC TTT GAA CTA AAA GAC GGG ATT ATG TAC CTT AAC GGC CAG			2902
Phe Arg Asn Phe Glu Leu Lys Asp Gly Ile Met Tyr Leu Asn Gly Gln			
330	335	340	
CGG ATC GTC TTC AAG GGG GCC AAC CGG CAC GAA TTT GAC AGT AAG TTG			2950
Arg Ile Val Phe Lys Gly Ala Asn Arg His Glu Phe Asp Ser Lys Leu			
345	350	355	
GGC CGG GCT ATC ACA GAA GAG GAT ATG ATC TGG GAT ATC AAG ACC ATG			2998
Gly Arg Ala Ile Thr Glu Glu Asp Met Ile Trp Asp Ile Lys Thr Met			
360	365	370	
AAG CGA AGC AAC ATC AAT GCT GTC CGC TGC TCT CAC TAC CCG AAC CAG			3046
Lys Arg Ser Asn Ile Asn Ala Val Arg Cys Ser His Tyr Pro Asn Gln			
375	380	385	390
TCC CTC TTT TAC CGG CTC TGT GAC AAG TAC GGC CTT TAC GTC ATT GAT			3094
Ser Leu Phe Tyr Arg Leu Cys Asp Lys Tyr Gly Leu Tyr Val Ile Asp			
395	400	405	

GAA GCT AAC CTG GAA AGC CAC GGC ACC TGG GAA AAA GTG GGG GGG CAC Glu Ala Asn Leu Glu Ser His Gly Thr Trp Glu Lys Val Gly Gly His 410 415 420	3142
GAA GAT CCT AGC TTC AAT GTT CCA GGC GAT GAC CAG CAT TGG CTG GGA Glu Asp Pro Ser Phe Asn Val Pro Gly Asp Asp Gln His Trp Leu Gly 425 430 435	3190
GCC AGC TTA TCC CGG GTG AAG AAC ATG ATG GCT CGG GAC AAG AAC CAT Ala Ser Leu Ser Arg Val Lys Asn Met Met Ala Arg Asp Lys Asn His 440 445 450	3238
GCT TCA ATC CTG ATC TGG TCT TTA GGC AAT GAG TCT TAC GCC GGC ACT Ala Ser Ile Leu Ile Trp Ser Leu Gly Asn Glu Ser Tyr Ala Gly Thr 455 460 465 470	3286
GTC TTT GCC CAA ATG GCT GAT TAC GTC CGG AAG GCT GAT CCG ACC CGG Val Phe Ala Gln Met Ala Asp Tyr Val Arg Lys Ala Asp Pro Thr Arg 475 480 485	3334
GTT CAG CAC TAT GAA GGG GTG ACC CAC AAC CGG AAG TTT GAC GAC GCC Val Gln His Tyr Glu Gly Val Thr His Asn Arg Lys Phe Asp Asp Ala 490 495 500	3382
ACC CAG ATT GAA AGC CGG ATG TAT GCT CCG GCC AAG GTA ATT GAA GAA Thr Gln Ile Glu Ser Arg Met Tyr Ala Pro Ala Lys Val Ile Glu Glu 505 510 515	3430
TAC TTG ACC AAT AAA CCA GCC AAG CCA TTT ATC TCA GTT GAA TAC GCT Tyr Leu Thr Asn Lys Pro Ala Lys Pro Phe Ile Ser Val Glu Tyr Ala 520 525 530	3478
CAC GCC ATG GGC AAC TCC GTC GGT GAC CTG GCC GCC TAC ACG GCC CTG His Ala Met Gly Asn Ser Val Gly Asp Leu Ala Ala Tyr Thr Ala Leu 535 540 545 550	3526
GAA AAA TAC CCC CAC TAC CAG GGC GGC TTC ATC TGG GAC TGG ATT GAC Glu Lys Tyr Pro His Tyr Gln Gly Gly Phe Ile Trp Asp Trp Ile Asp 555 560 565	3574
CAA GGA CTG GAA AAA GAC GGG CAC CTG CTT TAT GGG GGC GAC TTC GAT Gln Gly Leu Glu Lys Asp Gly His Leu Leu Tyr Gly Asp Phe Asp 570 575 580	3622
GAC CGG CCA ACC GAC TAT GAA TTC TGC GGG AAC GGC CTG GTC TTT GCT Asp Arg Pro Thr Asp Tyr Glu Phe Cys Gly Asn Gly Leu Val Phe Ala 585 590 595	3670
GAC CGG ACT GAA TCG CCG AAA CTG GCT AAT GTC AAG GCC CTT TAC GCC Asp Arg Thr Glu Ser Pro Lys Leu Ala Asn Val Lys Ala Leu Tyr Ala 600 605 610	3718
AAC CTT AAG TTA GAA GTA AAA GAT GGG CAG CTC TTC CTC AAA AAC GAC Asn Leu Lys Leu Glu Val Lys Asp Gly Gln Leu Phe Leu Lys Asn Asp 615 620 625 630	3766

AAT TTA TTT ACC AAC AGC TCA TCT TAC TAC TTC TTG ACT AGT CTT TTG Asn Leu Phe Thr Asn Ser Ser Ser Tyr Tyr Phe Leu Thr Ser Leu Leu 635 640 645	3814
GTC GAT GGC AAG TTG ACC TAC CAG AGC CGG CCT CTG ACC TTT GGC CTG Val Asp Gly Lys Leu Thr Tyr Gln Ser Arg Pro Leu Thr Phe Gly Leu 650 655 660	3862
GAG CCT GGC GAA TCC GGG ACC TTT GCC CTG CCT TGG CCG GAA GTC GCT Glu Pro Gly Glu Ser Gly Thr Phe Ala Leu Pro Trp Pro Glu Val Ala 665 670 675	3910
GAT GAA AAA GGA GAG GTC GTC TAC CCG GTA ACG GCC CAC TTA AAA GAA Asp Glu Lys Gly Glu Val Val Tyr Arg Val Thr Ala His Leu Lys Glu 680 685 690	3958
GAC TTG CCT TGG GCG GAT GAG GGC TTC ACT GTG GCT GAA GCA GAA GAA Asp Leu Pro Trp Ala Asp Glu Gly Phe Thr Val Ala Glu Ala Glu Glu 695 700 705 710	4006
GTA GCT CAA AAG CTG CCG GAA TTT AAG CCG GAA GGG CGG CCA GAT TTA Val Ala Gln Lys Leu Pro Glu Phe Lys Pro Glu Gly Arg Pro Asp Leu 715 720 725	4054
GTT GAT TCC GAC TAC AAC CTA GGC CTG AAA GGA AAT AAC TTC CAA ATT Val Asp Ser Asp Tyr Asn Leu Gly Leu Lys Gly Asn Asn Phe Gln Ile 730 735 740	4102
CTC TTC TCC AAG GTC AAG GGC TGG CCG GTT TCC CTC AAG TAT GCC GGT Leu Phe Ser Val Lys Gly Trp Pro Val Ser Leu Lys Tyr Ala Gly 745 750 755	4150
AGG GAA TAC TTG AAG CGG CTG CCG GAA TTT ACC TTC TGG CGG GCC CTG Arg Glu Tyr Leu Lys Arg Leu Pro Glu Phe Thr Phe Trp Arg Ala Leu 760 765 770	4198
ACG GAC AAC GAC CGG GGA GCT GGT TAC GGC TAT GAT CTG GCC CGG TGG Thr Asp Asn Asp Arg Gly Ala Gly Tyr Gly Tyr Asp Leu Ala Arg Trp 775 780 785 790	4246
GAA AAT GCC GGC AAG TAT GCC CGC TTG AAA GAC ATC AGC TGC GAG GTC Glu Asn Ala Gly Lys Tyr Ala Arg Leu Lys Asp Ile Ser Cys Glu Val 795 800 805	4294
AAG GAA GAC TCC GTT TTG GTC AAG ACT GCC TTT ACG TTG CCT GTC GCC Lys Glu Asp Ser Val Leu Val Lys Thr Ala Phe Thr Leu Pro Val Ala 810 815 820	4342
TTA AAG GGT GAT TTA ACT GTG ACC TAT GAA GTC GAT GGA CGG GGC AAG Leu Lys Gly Asp Leu Thr Val Thr Tyr Glu Val Asp Gly Arg Gly Lys 825 830 835	4390
ATT GCT GTA ACA GCT GAC TTC CCA GGC GCG GAA GAA GCC GGT CTC TTG Ile Ala Val Thr Ala Asp Phe Pro Gly Ala Glu Glu Ala Gly Leu Leu	4438

840	845	850	
CCA GCC TTT GGC TTG AAC CTG GCC CTG CCA AAA GAA CTG ACC GAT TAC Pro Ala Phe Gly Leu Asn Leu Ala Leu Pro Lys Glu Leu Thr Asp Tyr 855	860	865	4486
CGC TAC TAT GGT CTG GGA CCT AAT GAG AGC TAA CCAGACCGCT TGGAAGGTAA Arg Tyr Tyr Gly Leu Gly Pro Asn Glu Ser *	875	880	4539
TTACCTGGGC ATCTACCAGG GAGCGGTAAA AAAGAACCTTT AGCCCATACC TGCGTCCGCA			4599
GGAAACGGGC AACCGGAGCA AGGTCGCTG GTACCAGCTC TTTGATGAAA AGGGCGGCTT			4659
GGAATTACG GCCAATGGGG CAGACTTGAA CTTGTCTGCT TTGCCATATT CTGCCGCCA			4719
AATTGAAGCA CGGGACCACG CTTTGAACT GACTAACAAAT TACACTGGG TTAGAGCCTT			4779
AAGCGCCCAG ATGGGGGTCG GCAGGGATGA CTCCTGGGG CAGAAGGTCC ACCCGGAATT			4839
CTGCCTGGAT GCTAAAAAG CCCGCCAGCT CCGCCTGGTG ATTCAAGCCCC TTTTACTAAA			4899
ATAAAATGCTA CAATTGACTT AACAGGATGA AATTTTAGTA AAAGCAAAGC GAGTGAGGAA			4959
GATGGCAACG ATCAGAGAAG TGCCAAGGCA GCCGGCGTGT CGCTAGCGAC GGTTTCCCGC			5019
GTCTTGAACT ATGACCAGAC CCTGTCAGTC AATGAGGCAA			5059

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 584 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Ile Phe Ile Ile Thr Asn Leu Ile Thr Ala Ile Arg Ile Gly Glu
1 5 10 15

Val Leu Leu Asp Pro Leu Ile Gly Asn Ala Ile Asp Arg Thr Glu Ser
20 25 30

Arg Trp Gly Lys Phe Lys Pro Trp Val Val Gly Gly Ile Ile Ser
35 40 45

Ser Leu Ala Leu Leu Ala Leu Phe Thr Asp Phe Gly Gly Ile Asn Gln
50 55 60

Ser Asn Pro Val Val Tyr Leu Val Ile Phe Gly Ile Val Tyr Leu Ile
65 70 75 80

Met Asp Ile Phe Tyr Ser Phe Asp Thr Gly Phe Trp Ala Met Ile

85	90	95
Pro Ala Leu Ser Leu Asp Ser Arg Glu Arg Glu Lys Thr Ser Thr Phe		
100	105	110
Ala Arg Val Gly Ser Thr Ile Gly Ala Asn Leu Val Gly Val Val Ile		
115	120	125
Thr Pro Ile Ile Leu Phe Phe Ser Ala Ser Lys Ala Asn Pro Asn Gly		
130	135	140
Asp Lys Gln Gly Trp Phe Phe Ala Leu Ile Val Ala Ile Val Gly		
145	150	155
Ile Leu Thr Ser Ile Thr Val Gly Leu Gly Thr His Glu Val Lys Ser		
165	170	175
Ala Leu Arg Glu Ser Asn Glu Lys Thr Thr Leu Lys Gln Val Phe Lys		
180	185	190
Val Leu Gly Gln Asn Asp Gln Leu Leu Trp Leu Ala Phe Ala Tyr Trp		
195	200	205
Phe Tyr Gly Leu Gly Ile Asn Thr Leu Asn Ala Leu Gln Leu Tyr Tyr		
210	215	220
Phe Ser Tyr Ile Leu Gly Asp Ala Arg Gly Tyr Ser Leu Leu Tyr Thr		
225	230	235
Ile Asn Thr Phe Val Gly Leu Ile Ser Ala Ser Phe Phe Pro Ser Leu		
245	250	255
Ala Lys Lys Phe Asn Arg Asn Arg Leu Phe Tyr Ala Cys Ile Ala Val		
260	265	270
Met Leu Leu Gly Ile Gly Val Phe Ser Val Ala Ser Gly Ser Leu Ala		
275	280	285
Leu Ser Leu Val Gly Ala Glu Phe Phe Phe Ile Pro Gln Pro Leu Ala		
290	295	300
Phe Leu Val Val Leu Met Ile Ile Ser Asp Ala Val Glu Tyr Gly Gin		
305	310	315
320		
Leu Lys Thr Gly His Arg Asp Glu Ala Leu Thr Leu Ser Val Arg Pro		
325	330	335
Leu Val Asp Lys Leu Gly Gly Ala Leu Ser Asn Trp Phe Val Ser Leu		
340	345	350
Ile Ala Leu Thr Ala Gly Met Thr Thr Gly Ala Thr Ala Ser Thr Ile		
355	360	365
Thr Ala His Gly Gln Met Val Phe Lys Leu Ala Met Phe Ala Leu Pro		
370	375	380

Ala Val Met Leu Leu Ile Ala Val Ser Ile Phe Ala Lys Lys Val Phe
 385 390 395 400

 Leu Thr Glu Glu Lys His Ala Glu Ile Val Asp Gln Leu Glu Thr Gln
 405 410 415

 Phe Ser Gln Ser His Ala Gln Lys Pro Ala Gln Ala Glu Ser Phe Thr
 420 425 430

 Leu Ala Ser Pro Val Ser Gly Gln Leu Met Asn Leu Asp Met Val Asp
 435 440 445

 Asp Pro Val Phe Ala Asp Lys Lys Leu Gly Asp Gly Phe Ala Leu Val
 450 455 460

 Pro Ala Asp Gly Lys Val Tyr Ala Pro Phe Ala Gly Thr Val Arg Gln
 465 470 475 480

 Leu Ala Lys Thr Arg His Ser Ile Val Leu Glu Asn Glu His Gly Val
 485 490 495

 Leu Val Leu Ile His Leu Gly Leu Gly Thr Val Lys Leu Asn Gly Thr
 500 505 510

 Gly Phe Val Ser Tyr Val Glu Glu Gly Ser Gln Val Glu Ala Gly Gln
 515 520 525

 Gln Ile Leu Glu Phe Trp Asp Pro Ala Ile Lys Gln Ala Lys Leu Asp
 530 535 540

 Asp Thr Val Ile Val Thr Val Ile Asn Ser Glu Thr Phe Ala Asn Ser
 545 550 555 560

 Gln Met Leu Leu Pro Ile Gly His Ser Val Gln Ala Leu Asp Asp Val
 565 570 575

 Phe Lys Leu Glu Gly Lys Asn *
 580

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 881 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Met Ser Asn Lys Leu Val Lys Glu Lys Arg Val Asp Gln Ala Asp Leu
 1 5 10 15

Ala Trp Leu Thr Asp Pro Glu Val Tyr Glu Val Asn Thr Ile Pro Pro
 20 25 30

His Ser Asp His Glu Ser Phe Gln Ser Gln Glu Glu Leu Glu Glu Gly
 35 40 45

Lys Ser Ser Leu Val Gln Ser Leu Asp Gly Asp Trp Leu Ile Asp Tyr
 50 55 60

Ala Glu Asn Gly Gln Gly Pro Val Asn Phe Tyr Ala Glu Asp Phe Asp
 65 70 75 80

Asp Ser Asn Phe Lys Ser Val Lys Val Pro Gly Asn Leu Glu Leu Gln
 85 90 95

Gly Phe Gly Gln Pro Gln Tyr Val Asn Val Gln Tyr Pro Trp Asp Gly
 100 105 110

Ser Glu Glu Ile Phe Pro Pro Gln Ile Pro Ser Lys Asn Pro Leu Ala
 115 120 125

Ser Tyr Val Arg Tyr Phe Asp Leu Asp Glu Ala Phe Trp Asp Lys Glu
 130 135 140

Val Ser Leu Lys Phe Asp Gly Ala Ala Thr Ala Ile Tyr Val Trp Leu
 145 150 155 160

Asn Gly His Phe Val Gly Tyr Gly Glu Asp Ser Phe Thr Pro Ser Glu
 165 170 175

Phe Met Val Thr Lys Phe Leu Lys Lys Glu Asn Asn Arg Leu Ala Val
 180 185 190

Ala Leu Tyr Lys Tyr Ser Ser Ala Ser Trp Leu Glu Asp Gln Asp Phe
 195 200 205

Trp Arg Met Ser Gly Leu Phe Arg Ser Val Thr Leu Gln Ala Lys Pro
 210 215 220

Arg Leu His Leu Glu Asp Leu Lys Leu Thr Ala Ser Leu Thr Asp Asn
 225 230 235 240

Tyr Gln Lys Gly Lys Leu Glu Val Glu Ala Asn Ile Ala Tyr Arg Leu
 245 250 255

Pro Asn Ala Ser Phe Lys Leu Glu Val Arg Asp Ser Glu Gly Asp Leu
 260 265 270

Val Ala Glu Lys Leu Gly Pro Ile Arg Ser Glu Gln Leu Glu Phe Thr
 275 280 285

Leu Ala Asp Leu Pro Val Ala Ala Trp Ser Ala Glu Lys Pro Asn Leu
 290 295 300

Tyr Gln Val Arg Leu Tyr Leu Tyr Gln Ala Gly Ser Leu Leu Glu Val
 305 310 315 320

Ser Arg Gln Glu Val Gly Phe Arg Asn Phe Glu Leu Lys Asp Gly Ile
 325 330 335
 Met Tyr Leu Asn Gly Gln Arg Ile Val Phe Lys Gly Ala Asn Arg His
 340 345 350
 Glu Phe Asp Ser Lys Leu Gly Arg Ala Ile Thr Glu Glu Asp Met Ile
 355 360 365
 Trp Asp Ile Lys Thr Met Lys Arg Ser Asn Ile Asn Ala Val Arg Cys
 370 375 380
 Ser His Tyr Pro Asn Gln Ser Leu Phe Tyr Arg Leu Cys Asp Lys Tyr
 385 390 395 400
 Gly Leu Tyr Val Ile Asp Glu Ala Asn Leu Glu Ser His Gly Thr Trp
 405 410 415
 Glu Lys Val Gly Gly His Glu Asp Pro Ser Phe Asn Val Pro Gly Asp
 420 425 430
 Asp Gln His Trp Leu Gly Ala Ser Leu Ser Arg Val Lys Asn Met Met
 435 440 445
 Ala Arg Asp Lys Asn His Ala Ser Ile Leu Ile Trp Ser Leu Gly Asn
 450 455 460
 Glu Ser Tyr Ala Gly Thr Val Phe Ala Gln Met Ala Asp Tyr Val Arg
 465 470 475 480
 Lys Ala Asp Pro Thr Arg Val Gln His Tyr Glu Gly Val Thr His Asn
 485 490 495
 Arg Lys Phe Asp Asp Ala Thr Gln Ile Glu Ser Arg Met Tyr Ala Pro
 500 505 510
 Ala Lys Val Ile Glu Glu Tyr Leu Thr Asn Lys Pro Ala Lys Pro Phe
 515 520 525
 Ile Ser Val Glu Tyr Ala His Ala Met Gly Asn Ser Val Gly Asp Leu
 530 535 540
 Ala Ala Tyr Thr Ala Leu Glu Lys Tyr Pro His Tyr Gln Gly Gly Phe
 545 550 555 560
 Ile Trp Asp Trp Ile Asp Gln Gly Leu Glu Lys Asp Gly His Leu Leu
 565 570 575
 Tyr Gly Gly Asp Phe Asp Asp Arg Pro Thr Asp Tyr Glu Phe Cys Gly
 580 585 590
 Asn Gly Leu Val Phe Ala Asp Arg Thr Glu Ser Pro Lys Leu Ala Asn
 595 600 605
 Val Lys Ala Leu Tyr Ala Asn Leu Lys Leu Glu Val Lys Asp Gly Gln

610	615	620
Leu Phe Leu Lys Asn Asp Asn Leu Phe Thr Asn Ser Ser Ser Tyr Tyr		
625	630	635
Phe Leu Thr Ser Leu Leu Val Asp Gly Lys Leu Thr Tyr Gln Ser Arg		
645	650	655
Pro Leu Thr Phe Gly Leu Glu Pro Gly Glu Ser Gly Thr Phe Ala Leu		
660	665	670
Pro Trp Pro Glu Val Ala Asp Glu Lys Gly Glu Val Val Tyr Arg Val		
675	680	685
Thr Ala His Leu Lys Glu Asp Leu Pro Trp Ala Asp Glu Gly Phe Thr		
690	695	700
Val Ala Glu Ala Glu Glu Val Ala Gln Lys Leu Pro Glu Phe Lys Pro		
705	710	715
Glu Gly Arg Pro Asp Leu Val Asp Ser Asp Tyr Asn Leu Gly Leu Lys		
725	730	735
Gly Asn Asn Phe Gln Ile Leu Phe Ser Lys Val Lys Gly Trp Pro Val		
740	745	750
Ser Leu Lys Tyr Ala Gly Arg Glu Tyr Leu Lys Arg Leu Pro Glu Phe		
755	760	765
Thr Phe Trp Arg Ala Leu Thr Asp Asn Asp Arg Gly Ala Gly Tyr Gly		
770	775	780
Tyr Asp Leu Ala Arg Trp Glu Asn Ala Gly Lys Tyr Ala Arg Leu Lys		
785	790	795
Asp Ile Ser Cys Glu Val Lys Glu Asp Ser Val Leu Val Lys Thr Ala		
805	810	815
Phe Thr Leu Pro Val Ala Leu Lys Gly Asp Leu Thr Val Thr Tyr Glu		
820	825	830
Val Asp Gly Arg Gly Lys Ile Ala Val Thr Ala Asp Phe Pro Gly Ala		
835	840	845
Glu Glu Ala Gly Leu Leu Pro Ala Phe Gly Leu Asn Leu Ala Leu Pro		
850	855	860
Lys Glu Leu Thr Asp Tyr Arg Tyr Tyr Gly Leu Gly Pro Asn Glu Ser		
865	870	875
880		

*

REVENDICATIONS

- 1) Souche mutante de *L. bulgaricus* dépourvue d'activité β -galactosidase, caractérisée en ce qu'elle 5 porte une mutation non-sens, dans au moins l'une des séquences codantes de l'opéron lactose.
- 2) Souche mutante de *L. bulgaricus* selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite séquence codante est la séquence codant pour la β -galactosidase.
- 10 3) Souche mutante de *L. bulgaricus* selon une quelconque des revendications 1 ou 2, déposée le 8 janvier 1998, auprès de la CNCM sous le numéro I-1968.
- 15 4) Ferment lactique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une souche de *L. bulgaricus* selon une quelconque des revendications 1 à 3.
- 5) Ferment lactique selon la revendication 4 caractérisé en ce que ladite souche de *L. bulgaricus* est associée à au moins une souche de *S. thermophilus*.
- 20 6) Procédé de préparation d'un produit laitier fermenté, caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle on fermente du lait à l'aide d'un ferment lactique comprenant au moins une souche de *L. bulgaricus* selon une quelconque des revendications 1 à 3, en présence d'au moins un sucre assimilable par ladite souche.
- 25 7) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit sucre assimilable est le glucose.
- 30 8) Procédé selon une quelconque des revendications 6 ou 7, caractérisé en ce que l'arrêt de la fermentation s'effectue sans refroidissement dudit produit laitier.
- 35 9) Produit laitier fermenté susceptible d'être obtenu par un procédé selon une quelconque des revendications 6 à 8.

10) Produit laitier fermenté selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit produit est un yoghourt.

feuille rectifiée

REVENDICATIONS

- 1) Souche mutante de *L. bulgaricus* dépourvue d'activité β -galactosidase, caractérisée en ce qu'elle 5 porte une mutation non-sens, dans au moins l'une des séquences codantes de l'opéron lactose.
- 2) Souche mutante de *L. bulgaricus* selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite séquence codante est la séquence codant pour la β -galactosidase.
- 10 3) Souche mutante de *L. bulgaricus* selon une quelconque des revendications 1 ou 2, déposée le 14 janvier 1998, auprès de la CNCM sous le numéro I-1968.
- 15 4) Ferment lactique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une souche de *L. bulgaricus* selon une quelconque des revendications 1 à 3.
- 5) Ferment lactique selon la revendication 4 caractérisé en ce que ladite souche de *L. bulgaricus* est associée à au moins une souche de *S. thermophilus*.
- 20 6) Procédé de préparation d'un produit laitier fermenté, caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle on fermente du lait à l'aide d'un ferment lactique comprenant au moins une souche de *L. bulgaricus* selon une quelconque des revendications 1 à 3, en présence d'au moins un sucre assimilable par ladite 25 souche.
- 7) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit sucre assimilable est le glucose.
- 30 8) Procédé selon une quelconque des revendications 6 ou 7, caractérisé en ce que l'arrêt de la fermentation s'effectue sans refroidissement dudit produit laitier.
- 35 9) Produit laitier fermenté susceptible d'être obtenu par un procédé selon une quelconque des revendications 6 à 8.

FIGURE 1

